

PCT/BR03/00177

#2



REC'D. 22 DEC 2003

WIPO

PCT

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e Comércio Exterior.
Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Diretoria de Patentes


CÓPIA OFICIAL

PARA EFEITO DE REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

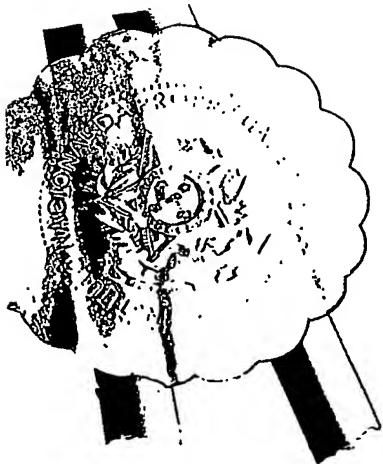
BEST AVAILABLE COPY

O documento anexo é a cópia fiel de um
Pedido de Patente de Invenção
Regularmente depositado no Instituto
Nacional da Propriedade Industrial, sob
Número PI 0207141-0 de 28/11/2002.

Rio de Janeiro, 08 de Dezembro de 2003.


GLÓRIA REGINA COSTA
Chefe do NUCAD
Mat. 00449119

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



INPI/SP
28 NOV 15 23 005640

DEPÓSITO DE PATENTE
Protocolo

Número (21)

DEPÓSITO

Pedido de Patente ou de
Certificado de Adição



PI0207141-0

depósito

data de depósito

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: José Agustín Quincoces Suárez e outros

1.2 Qualificação: cubano, químico 1.3 CGC/CPF: 22500232808

1.4 Endereço completo: Rua Barão de Tatuí, nº 427, apto. 41, Santa Cecília, São Paulo, SP, CEP 01226-030

1.5 Telefone:

FAX:

☒ continua em folha anexa

2. Natureza:

☒ 2.1 Invenção

☐ 2.1.1. Certificado de Adição

☐ 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: Patente de Invenção

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):
Propriedades antitumorais do 1,5-Bis(4-hidr

☒ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão do pedido nº , de

5. Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade:
Nº de depósito Data de Depósito (66)

6. Prioridade - o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

7. Inventor (72):

☐ continua em folha anexa

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

7.1 Nome: José Agustín Quincoces Suárez e outros

7.2 Qualificação: cubano, químico

7.3 Endereço: Rua Barão de Tatui, nº 427, apto. 41, Santa Cecília, São Paulo, SP, CEP 01226-030
7.4 CEP: 01226030 7.5 Telefone

☒ continua em folha anexa

8. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

☐ em anexo

9. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):

(art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo nº 127/97):

O depositante declara que o objeto do presente pedido de privilégio vem sendo divulgado desde Janeiro de 2002.

☐ em anexo

10. Procurador (74):

10.1 Nome Bêerre Assessoria Empresarial S/C. Ltda.

CPF/CGC: 54127295000190

10.2 Endereço: Av. Barão de Itapura, nº 3236, Taquaral, Campinas, SP.

10.3 CEP: 13076000 10.4 Telefone 19 3255 3222

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/> 11.1 Guia de recolhimento	01 fls.	<input checked="" type="checkbox"/> 11.5 Relatório descritivo	25 fls.
<input checked="" type="checkbox"/> 11.2 Procuração	03 fls.	<input checked="" type="checkbox"/> 11.6 Reivindicações	06 fls.
<input type="checkbox"/> 11.3 Documentos de prioridade	fls.	<input type="checkbox"/> 11.7 Desenhos	fls.
<input type="checkbox"/> 11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/> 11.8 Resumo	01 fls.
<input checked="" type="checkbox"/> 11.9 Outros (especificar): Folha anexa			02 fls.
<input type="checkbox"/> 11.10 Total de folhas anexadas:			38 fls.

12. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

28 NOV 2002

Local e Data

BÊERRE Assessoria Empresarial S/C Ltda.
Assinatura e Carimbo
Celino Bento de Souza - Advogado
OAB 108.745 - OIC 002.396.618-18
Agente INPI n.º 0772

Folha Anexa**1. Depositante :****1.1 Nome : José Agustín Quincoces Suárez****1.2 Qualificação : cubano, químico****1.3 CPF : 225.002.328-08****1.4 Endereço : Rua Barão de Tatuí, nº 427, apto. 41, Santa Cecília, São Paulo, SP, CEP 01226-030****1.1 Nome : Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo****1.2 Qualificação : pessoa jurídica de direito público****1.3 CNPJ/MF : 43828151000145****1.4 Endereço : Rua Pio XI, nº 1500, Alto da Lapa, São Paulo, SP, CEP 05468-901****1.1 Nome : Academia Paulista Anchieta S/C Ltda****1.2 Qualificação : empresa brasileira****1.3 CNPJ/MF : 62655261000105****1.4 Endereço : Rua Maria Cândida, nº 1813, Vila Guilherme, São Paulo, SP, CEP 02071-013****3. Título da Patente de Invenção :****“ Propriedades antitumorais do 1,5-Bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e derivados e seu procedimento de obtenção ”****7. Inventor :****7.1 Nome : José Agustín Quincoces Suárez (já qualificado).****7.1 Nome : Klaus Peseke****7.2 Qualificação : alemão, químico****7.3 Endereço : Haselhof 1, Lichtenhagen, 18107 Elmenhorst / Lichtenhagen, Alemanha****7.1 Nome : Marcus Kordian****7.2 Qualificação : alemão, químico****7.3 Endereço : Zorenappelweg 12, 18055 Rostock, Alemanha**

11/02/2014

- 7.1 Nome : **João Ernesto de Carvalho**
7.2 Qualificação : brasileiro, farmacologista
7.3 Endereço : Rua Emílio Ribas, nº 140, apto. 104, Cambuí, Campinas, SP
7.4 CEP : 13000-025



- 7.1 Nome : **Luciana Konecny Kohn**
7.2 Qualificação : brasileira, farmacologista
7.3 Endereço : Rua Cristovam Bonini, nº 12, Jd. Proença, Campinas, SP
7.4 CEP : 13096-040

- 7.1 Nome : **Marcia Aparecida Antônio**
7.2 Qualificação : brasileira, farmacologista
7.3 Endereço : Rua Victor Severino Zamperlim, nº 13, João Aranha, Paulínia, SP
7.4 CEP : 13140-000

- 7.1 Nome : **Heloiza Brunhari**
7.2 Qualificação : brasileira, farmacêutica
7.3 Endereço : Rua Sílvio Barbosa, nº 537, Vila São Jorge, Guarulhos, SP
7.4 CEP : 07111-010

" PROPRIEDADES ANTI-TUMORAIS DO 1,5-BIS(4-HIDROXI-3-METOXI-FENIL)-PENTA-1,4-DIEN-3-ONA E DERIVADOS E SEU PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO "

5 Trata a presente patente de Invenção de PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO 1,5-BIS(4-HIDROXI-3-METOXI-FENIL)-PENTA-1,4-DIEN-3-ONA E DERIVADOS E SEU PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO.

10 Antecedentes bibliográficos sobre o composto 1,5-Bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e derivados e seu procedimento de obtenção.

15 O composto denominado 1,5-Bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona é conhecido desde o ano 1927 quando E. Glaser e E. Tramer reportaram pela primeira vez sua síntese com um 60% de rendimento (Journal für praktische Chemie, 116, 331-346, 1927) a partir da vanilina e acetona em presença de ácido
20 clorídrico concentrado, usado como catalisador.

Posteriormente P. Ramanan e M. Rao sintetizaram este produto em 1989 (Indian Journal Pharm. Sci., 51, 207, 1989) a partir da 4-O-metoximetilvanilina e acetona em meio básico, obtendo um rendimento de 42% depois de purificar o mesmo empregando a
25 cromatografia de camada delgada (silica gel).

No ano 1997 um grupo integrado por S Sardjiman, et. al. (Eur. Journal Med. Chem.



32, 625-630, 1997) desenvolveram uma nova variante de síntese empregando quantidades equimoleculares de vanilina e acetona em presença de ácido clorídrico concentrado, reportando um 89% de rendimento bruto (sem purificar). Por esta razão o ponto de fusão indicado neste procedimento ficou 58 °C a menos do reportado por Glaser e Tramer.

M. Artico et. al. obtiveram também esta substância um ano mais tarde (Journal Med. Chem. 41, 3948-3960 , 1998) obtendo somente um rendimento bruto de 18%. A temperatura de fusão (114-116 °C) é inferior a reportada por Glaser e Tramer, o que faz pensar que o composto não foi obtido puro apesar do uso da cromatografia de coluna.

Encontramos adicionalmente na revisão bibliográfica o artigo de uma patente americana (United States Patent 4,521,629 de 4 de Junho de 1985) de N. Cortese et. al. intitulada: "Method for the preparation of 1,5-Bis-aryl-1,4-pentadien-3-ones". Esta invenção relata um método de obtenção de certas bis-arilpentadienonas fluoradas, que foram usadas como compostos intermediários para a preparação de amidinohidrazonas com propriedades inseticidas, mas não protege os produtos que aparecem em nossa solicitação de patente.

Além disso, foram encontrados (Beilstein) documentos de outras patentes relacionadas com esta família de compostos orgânicos. São eles:

1- "Hair tonics containing

bis(hydroxyphenyl)pentadienones". Autores da patente: Morita, Kazuyoshi; Hamada, Kazuto. Firma: Kanebo, Ltd, Japan. País: Jpn. Kokai Tokyo Koho, 7pp. Idioma: japonês. CA-Número: 134:183278. PI: JP 2001048756

5 A2 20010220 JP 1999-224982 19990809.

2- "Skin-lightening cosmetics containing distyryl ketones". Autor: Morita, Kazuyoshi. Firma: Kanebo, Ltd., Japan. País: Jpn. Kokai Tokyo Koho, 7pp. Idioma: japonês. CA-Número: 131:149078. PI: JP 11209235 A2 19990803 JP 1998-10414 19980122.

10 3- "Acidic plating baths and methods for electrodepositing bright and ductile zinc-nickel alloys and additive composition for these baths". Firma: McGean-Rohco, Inc., USA. Autor: Canaris, Valerie M. País: U.S., 8pp. Idioma: inglês. CA-Número: 111:183131. PI: US 4832802 A 19890523 US 1988-206017 19880610 EP 346161 A1 19891213 EP 1989-305925 19890612.

20 4- "Photopolymerizable compositions". Firma: Eastman Kodak Co., USA. Autores: Noonan, John M.; McConkey, Robert C.; Arcesi, J.A.; Rauner; Frederick J. País: Brit., 19 pp. Idioma: inglês PI: GB 1425476 A 19760218 GB 1973-3986 19730322 US 3748133 A 19730724 US 1972-237929 19720324.

25 Tampouco nenhuma destas quatro patentes está relacionada nem direta nem indiretamente com as propriedades antiproliferativas que mostraram o 1,5-Bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,4-pentadien-3-

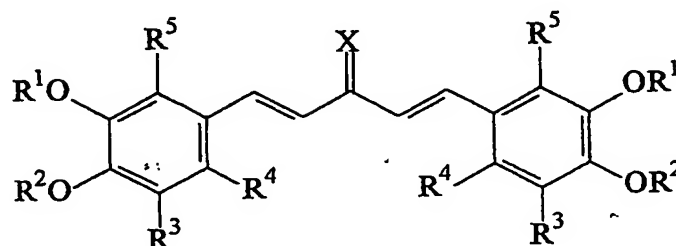
ona e seus derivados.

Levando em conta a revisão bibliográfica realizada pela empresa Bypropind Marcas e Patentes com base em varredura na coleção do Chemical Abstracts, do Lifescience, do Biomed da biblioteca da Fio-
5 ocruz e por nós na coleção Beilstein, chegamos a conclusão que não existe patente desse composto e seus derivados aplicável no tratamento do câncer, nem mesmo a técnica ultrasônica apesar do composto ter sido sintetizado no
10 ano 1927 e que é possível e legítimo o pedido de patente.

A presente patente de invenção relata as propriedades antitumorais do 1,5-Bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e derivados e seu procedimento de obtenção.

15 A amostra denominada composto 37/01 foi obtida com alto rendimento e pureza pela técnica ultrasônica apresentando atividade citostática (inibição do crescimento) nas concentrações avaliadas e atividade citocida (morte celular) a partir da concentração de
20 0,25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ frente a nove diferentes tipos de câncer humano. Este composto possui uma DL_{50} , igual a 8,54 g / Kg. Isto significa que este produto pode considerar-se como praticamente atóxico. A Doxorubicina, medicamento anticancerígeno usado como referência em todos
25 estes testes, é um produto extremadamente tóxico (DL_{50} de 20 mg / Kg) e não inibe o crescimento da linhagem celular Mama NCI-ADR (linhagem celular que expressa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas), portanto nosso pro-

duto se mostrou com ação fortemente citostática.



- 37 : $R^1 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{H}$; $R^3 = \text{H}$; $R^4 = \text{H}$; $R^5 = \text{H}$; $X = \text{O}$
 EHB1 : $R^1 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{H}_3\text{CCO}$; $R^3 = \text{H}$; $R^4 = \text{H}$; $R^5 = \text{H}$; $X = \text{O}$
 HB6 : $R^1 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$; $R^3 = \text{H}$;
 $R^4 = \text{H}$; $R^5 = \text{H}$; $X = \text{O}$
 HBM1 : $R^1 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CH}_3$; $R^3 = \text{H}$; $R^4 = \text{H}$; $R^5 = \text{H}$; $X = \text{O}$
 HB5 : $R^1 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{H}$; $R^3 = \text{H}$; $R^4 = \text{H}$; $R^5 = \text{H}$; $X = \text{C}(\text{CN})_2$
 HB10 : $R^1 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{H}$; $R^3 = \text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$; $R^4 = \text{H}$; $R^5 = \text{H}$;
 $X = \text{O}$
 HB11 : $R^1 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{H}$; $R^3 = \text{H}$; $R^4 = \text{H}$; $R^5 = \text{H}$;
 $X = \text{C}(\text{CN})\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$
 HB12 : $R^1 = \text{H}$; $R^2 = \text{H}$; $R^3 = \text{H}$; $R^4 = \text{H}$; $R^5 = \text{H}$; $X = \text{O}$
 HB13 : $R^1 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{H}$; $R^3 = \text{Br}$; $R^4 = \text{H}$; $R^5 = \text{H}$; $X = \text{O}$
 HB14 : $R^1 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$; $R^3 = \text{Br}$;
 $R^4 = \text{H}$; $R^5 = \text{H}$; $X = \text{O}$
 HB15 : $R^1 = \text{H}$; $R^2 = \text{H}$; $R^3 = \text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$;
 $R^4 = \text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$; $R^5 = \text{H}$; $X = \text{O}$

Atividade antitumoral exibida

5 pelos compostos sintetizados:

Legenda: NCI460 (tumor de pulmão); UACC62 (melanoma); MCF7 (tumor de mama normal); NCIADR (tumor de mama que expressa fenótipo de resistência a múltiplas drogas); HT29 (tumor de Cólon); 786-O (tumor renal); OVCAR-3 (tumor de Ovário); PC-3 (tumor de próstata); K-562 (Leucemia); DE₅₀ (doses efetiva 50 expressas em microgramas por mililitro $\mu\text{g/mL}$)

Composto	Linhagens Celulares Humanos testados DE ₅₀ (µg/mL)								
	UACC-62	MC-7	NCI-ADR	786-O	NCI-460	K-562	PC-03	OVCAR-03	HT29
37	0,03	0,04	0,27	0,65	0,5	0,6	0,41	0,72	0,75
EHB1	1,77	0,45	1,28	0,27	0,7	0,58	0,39	0,57	0,61
HB6	14,16	8,43	3,34	3,64	15,8	2,22	27,99	14	1,87
HBM1	0,75	0,71	0,84	1,19	0,66	0,65	0,82	0,82	0,86
HB5	1,25	1,96	1,11	2,67	2,58	2,84	1,59	43	1,26

Observação:

Todos estes resultados podem ser considerados muito bons, se tomamos como referência os publicados na literatura:

5 Banskota AH, et.al. Chemical Constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities; J. Nat. Prod. 61, 896-900, 1998

10 Banskota AH, et.al. Two Novel Cytotoxic Benzofuran Derivatives from Brazilian propolis; J. Nat Prod. 63, 1277-1279, 2000

Kimoto T, et.al. Apoptosis and Suppression of tumor growth by Artepillin C extracted from Brazilian Propolis; Cancer Detect. Prev. 22(6), 505-15, 1998.

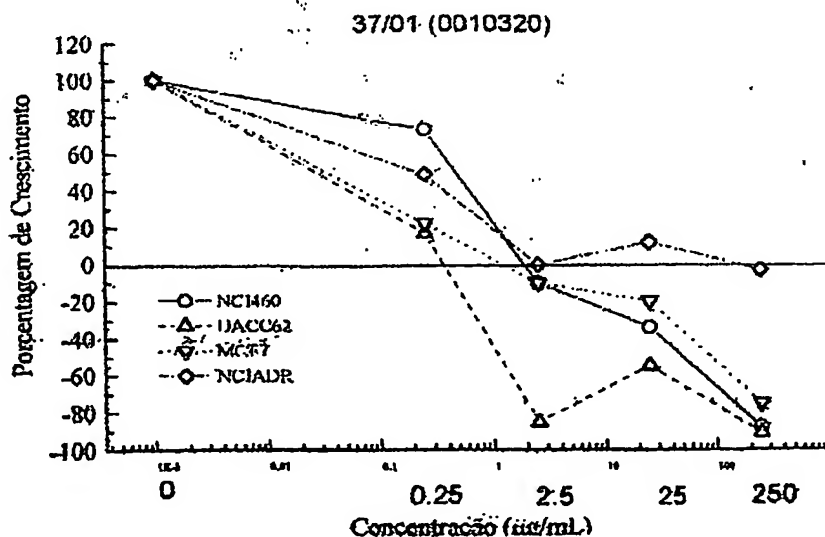
15 Observa-se que a maioria de nossos produtos mostraram uma forte ação antiproliferativa numa faixa de concentrações(em ppm) muito menores, que as exibidas por alguns dos compostos isolados da própolis brasileira.

**Citotoxicidade de alguns compostos isolados de
própolis brasileira por Banskota e Kimoto.**

Nome do composto	HT-1080	Colon L5-26
1 Ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-cromano-6-propenóico	71.53	77.07
2 Ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-il)-2-propenóico	46.86	50.22
3 Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico	45.47	59.32
4 Ácido 4-dihidro-cinamoiloxi-3-prenil-cinâmico	25.94	77.90

Queremos destacar que os produtos obtidos pela nossa equipe constituem matérias-primas de nosso projeto de pesquisa, a partir dos quais estamos obtendo novos derivados, guiados pelo princípio de analogia e pelos resultados das previsões TOPS-MODE.

Curvas concentração resposta dos compostos testados:

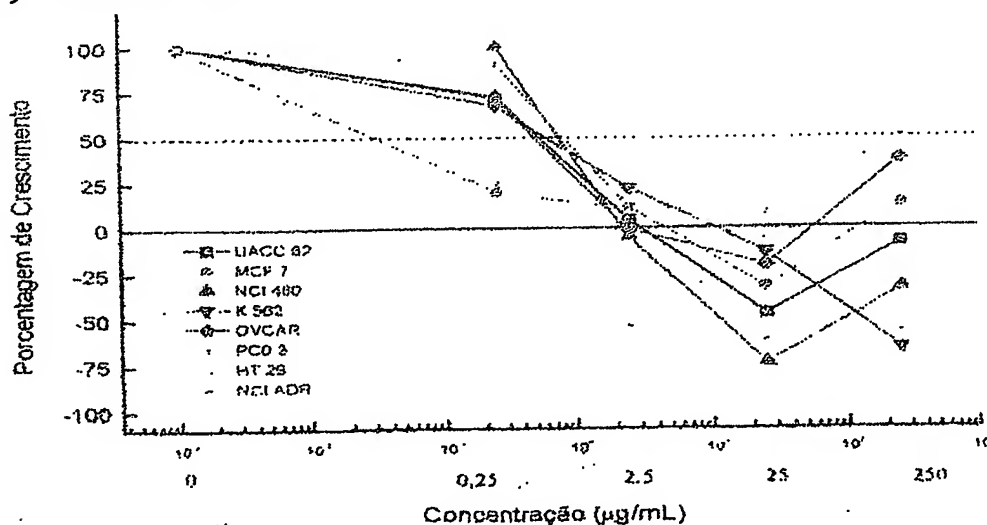


(18)

O composto 37, obtido mediante um procedimento de síntese orgânica, apresentou atividade citostática (inibição de crescimento) para todas as linhagens e atividade citocida (morte celular) para NCI460 (Pulmão), UACC62 (Melanoma) e MCF (Mama) e NCI-ADR (Mama resistente) a partir de 2,5 µg/mL nos primeiros testes antitumorais efetuados no CPQBA, UNICAMP, 24 de Setembro 2001.

Posteriormente foram ampliados estes testes de atividade antiproliferativa para as seguintes linhagens celulares:

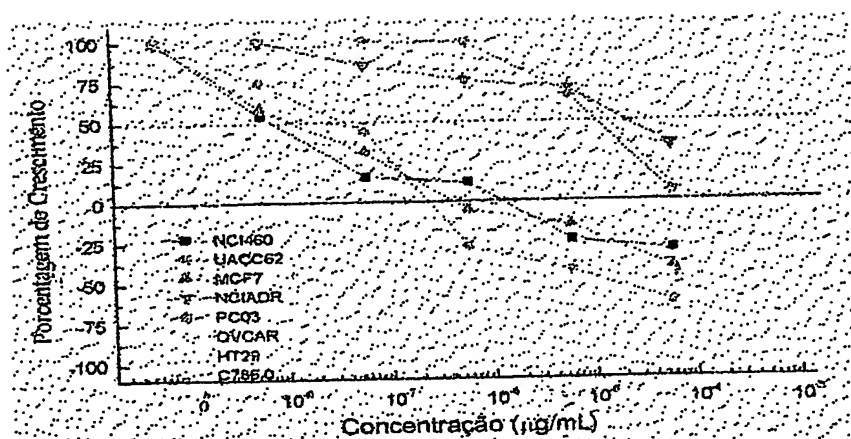
Cólon; Renal; Ovário; Próstata; Leucemia.



15 Curva Concentração resposta de 37.

Os resultados deste composto foram comparados com a Doxorubicina (anticancerígeno comercial empregado como padrão nestes testes) sendo os mesmos similares e em alguns casos superiores a este anticancerígeno comercial.

20

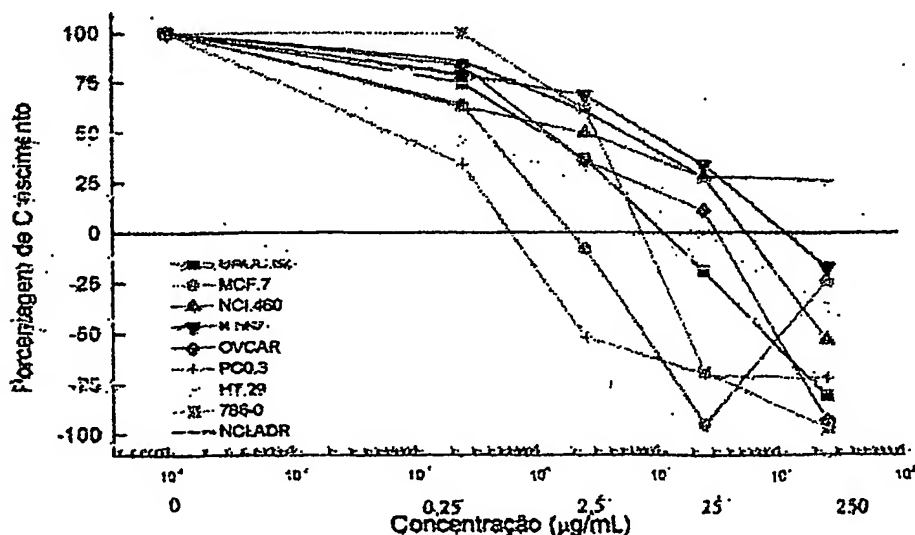


Curva Concentração resposta da Doxorubicina.

Por exemplo, nosso produto inibiu o crescimento da linhagem Mama NCIADR (linhagem que apresenta o fenótipo de resistência múltipla a drogas). Este resultado torna-se muito interessante já que a Doxorubicina, utilizada como controle positivo, não inibiu o crescimento desta linhagem celular humana.

Os derivados da 1,5-Bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona mostraram as seguintes ações antitumorais:

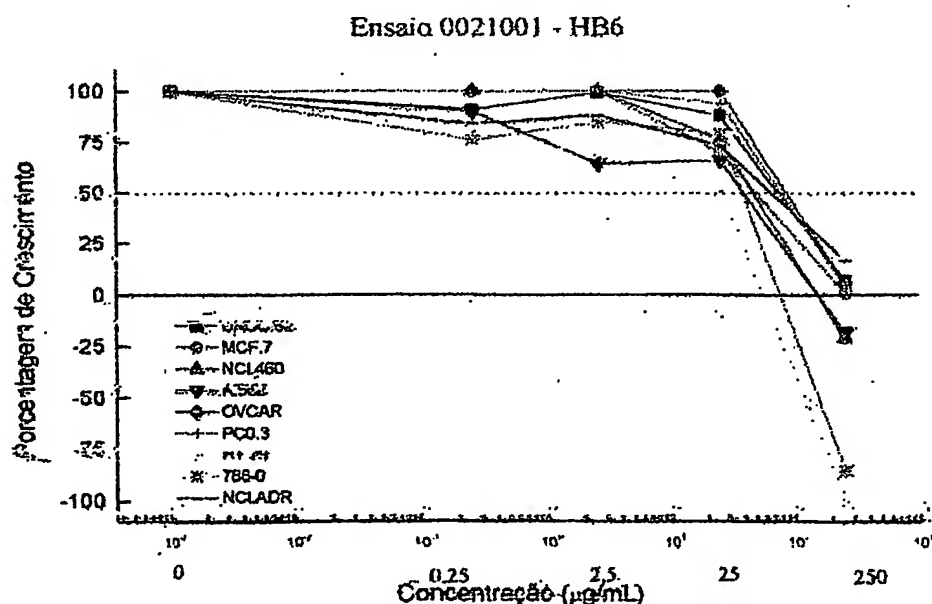
Ensaio 0021001 - EBH1





A amostra denominada composto EHB1 apresentou atividade citostática para todas as linhagens a partir da concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e atividade citocida a partir da concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, com exceção da linhagem NCI ADR que teve somente o seu crescimento inibido em torno de 25%. Os resultados demonstraram que esta amostra não foi seletiva para as linhagens celulares estudadas.

A amostra denominada composto HB6 apresentou atividade citostática para todas as linhagens a partir da concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ e atividade citocida na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, para as linhagens HT-29, 786-0, NCI ADR e K562. Além disso, esta amostra apresentou seletividade celular para as linhagens HT-29 e 786-0.



A amostra denominada composto HBMI apresentou atividade citostática para todas as

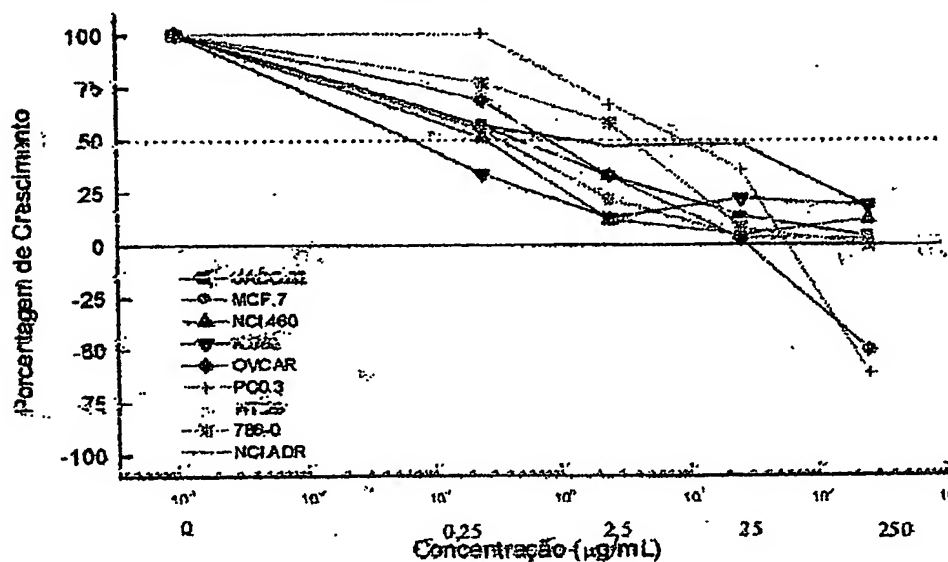
11/25

P10207141

28

linhagens a partir da concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$

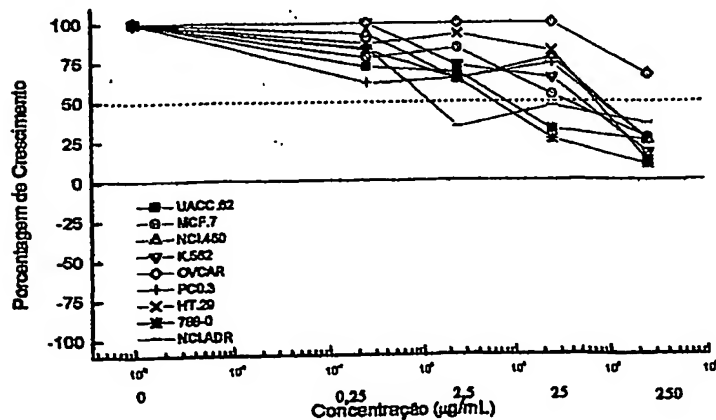
Ensaio 0021001 - HBM1



e somente apresentou atividade citocida para as linhagens PC-03 e OVCAR-3 na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$.

- A amostra denominada composto HB5 apresentou atividade citostática moderada para todas as linhagens a partir da concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e não apresentou atividade citocida para nenhuma linhagem nas concentrações utilizadas.

Ensaio 0021001 - HB5



12/25

PROPOSTA

(21)

- Também foi realizado teste toxicológico com a amostra denominada composto 37 (Toxicidade Aguda, DL_{50} via intraperitoneal). O valor de DL_{50} , calculado por regressão linear, foi igual a 8,54g/Kg, após 14 dias de observação. Isto significa que este produto pode considerar-se segundo Loomis, em Fundamentos de Toxicologia, como praticamente atóxico (compostos com valor de DL_{50} entre 5,0 a 15g/Kg são considerados praticamente atóxicos).

TABELA 1 – Peso corporal dos animais que receberam 2,5g/kg de peso corporal animal do produto denominado “COMPOSTO 37”, administrado por via intraperitoneal, no início e no final do teste de toxicidade aguda.

Animal	Peso Inicial (g)	Volume Adminis- trado (ml)	Peso Final (g)	Óbitos (n)
1	24,5	0,25	26,4	0
2	25,4	0,25	28,0	0
3	25,4	0,25	28,6	0
4	24,1	0,24	27,4	0
5	26,6	0,27	29,0	0
6	24,8	0,25	27,8	0
7	22,5	0,23	25,0	0
8	29,7	0,30	31,2	0
9	22,4	0,22	25,4	0
10	20,6	0,21	22,8	0

Média ± dpm: 24,60 ± 2,51

Média ± dpm: 27,88 ± 1,02

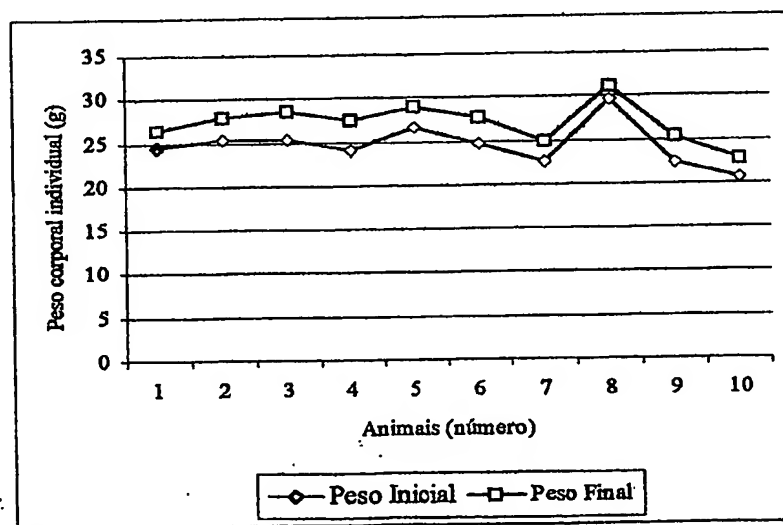


GRÁFICO 1 – Evolução do peso corporal dos animais que receberam 2,5g/kg de peso corporal animal do produto denominado “COMPOSTO 37”, administrado por via intraperitoneal, no início e no final do teste de toxicidade aguda.

23

TABELA 2 – Peso corporal dos animais que receberam 3,0g/kg de peso corporal animal do produto denominado “COMPOSTO 37”, administrado por via intraperitoneal, no início e no final do teste de toxicidade aguda.

Ani- mal	Peso Inicial (g)	Volume Adminis- trado (ml)	Peso Final (g)	Óbitos (n)
1	28,3	0,28	30,3	0
2	30,9	0,31	32,5	0
3	24,6	0,25	25,9	0
4	25,4	0,25	28,0	0
5	25,1	0,25	27,9	0
6	23,2	0,23	25,6	0
7	23,6	0,24	26,0	0
8	23,6	0,24	25,8	0
9	26,0	0,26	28,3	0
10	24,0	0,24	Óbito	1
Média ± dpm:	25,47 ± 2,43	Média ± dpm:	27,81 ± 2,35	

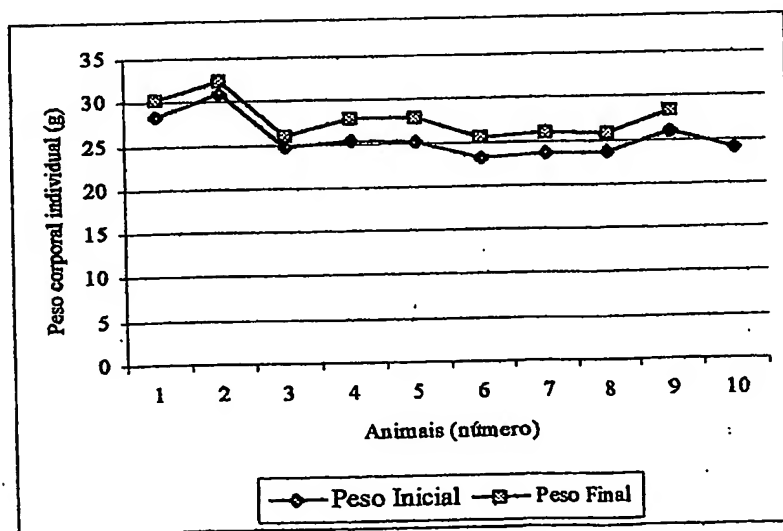


GRÁFICO 2 – Evolução do peso corporal dos animais que receberam 3,0g/kg de peso corporal animal do produto denominado “COMPOSTO 37”, administrado por via intraperitoneal, no início e no final do teste de toxicidade aguda.

TABELA 3 – Peso corporal dos animais que receberam 4,0g/kg de peso corporal animal do produto denominado "COMPOSTO 37", administrado por via intraperitoneal, no início e no final do teste de toxicidade aguda.

Animal	Peso Inicial (g)	VOLUME Adminis- trado (ml)	Peso Final (g)	Óbitos (n)
1	29,8	0,30	32,5	0
2	25,5	0,26	26,9	0
3	33,2	0,33	35,9	0
4	25,9	0,26	28,9	0
5	26,3	0,26	29,0	0
6	28,9	0,29	30,2	0
7	26,7	0,27	28,0	0
8	23,3	0,23	25,9	0
9	21,2	0,21	23,5	0
10	23,3	0,23	Óbito	1

Média ± dpm: 26,41 ± 3,52

Média ± dpm: 28,98 ± 3,65

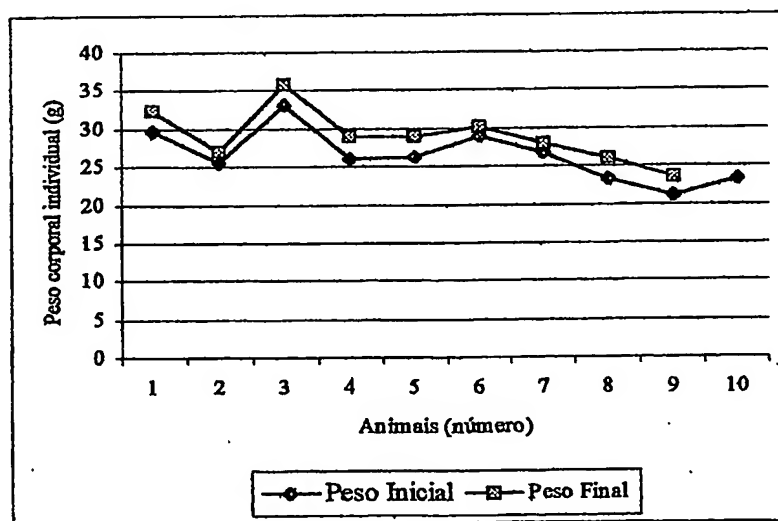


GRÁFICO 3 – Evolução do peso corporal dos animais que receberam 4,0g/kg de peso corporal animal do produto denominado "COMPOSTO 37", administrado por via intraperitoneal, no início e no final do teste de toxicidade aguda.

TABELA 4 – Peso corporal dos animais que receberam 5,0g/kg de peso corporal animal do produto denominado "COMPOSTO 37", administrado por via intraperitoneal, no início e no final do teste de toxicidade aguda.

Animal	Peso Inicial (g)	Volume Adminis- trado (ml)	Peso Final (g)	Óbitos (n)
1	24,9	0,25	25,9	0
2	21,0	0,21	24,0	0
3	25,4	0,25	27,8	0
4	22,2	0,22	25,6	0
5	24,0	0,24	27,0	0
6	23,8	0,24	25,8	0
7	22,5	0,23	24,9	0
8	23,5	0,24	25,9	0
9	24,2	0,24	Óbito	1
10	25,3	0,25	Óbito	1

Média ±
dpm:

23,68 ± 1,42

Média ± dpm:

25,86 ± 1,17.

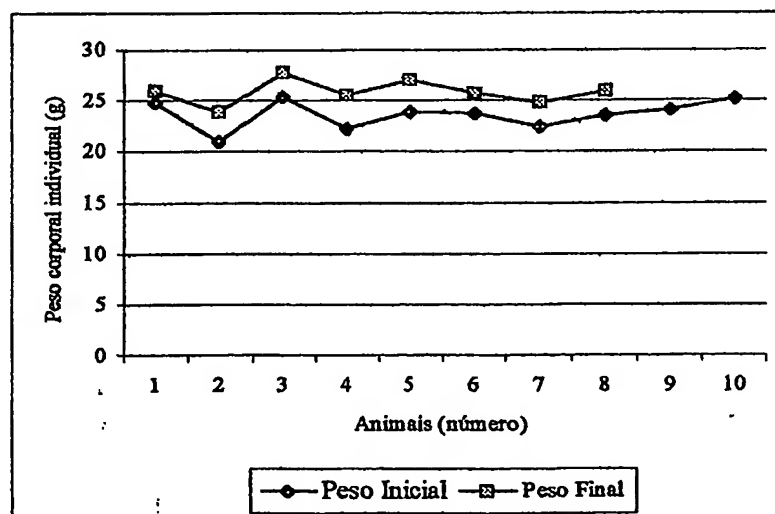


GRÁFICO 4 – Evolução do peso corporal dos animais que receberam 5,0g/kg de peso corporal animal do produto denominado "COMPOSTO 37", administrado por via intraperitoneal, no início e no final do teste de toxicidade aguda.

Esta invenção se ilustra a continuação mediante os seguintes exemplos de execução:

Exemplo 1.

Obtenção da 1,5-Bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona.

Procedimento de obtenção 1

A partir de vanilina e acetona em relação molar 2:1 em meio ácido, a temperaturas que oscilam entre 25 e 60 °C, sob condições de irradiação ultra-sônica numa faixa de 25 a 40 KHz por espaço de 1 a 3 horas colocando-se posteriormente a mistura de reação em água / gelo até a formação do produto bruto, que se dissolve em uma solução de hidróxido de sódio ou potássio (entre 10-30%) filtrando-se; e o filtrado é tratado com ácido clorídrico ou sulfúrico de uma concentração entre 10-30%, filtrando-se de novo o produto formado, finalmente se lava com água destilada até obter um pH neutro, sendo que esta operação se repete até a total purificação do produto, não sendo necessária fazer uma nova purificação do composto usando outros procedimentos como recristalização ou coluna cromatográfica (a pureza foi determinada mediante a técnica HPLC): Rendimento obtido: 92% do produto puro. Ponto de fusão de: 155-156 °C .

Procedimento de obtenção 2

Uma mistura constituída por vanilina e acetona em relação molar 2:1 em meio ácido e se deixa em repouso durante 5-8 dias, a temperaturas que oscilam entre -10 °C e 40 °C, colocando-se a mistura de



reação em água / gelo até a formação do produto bruto, que se dissolve em uma solução de hidróxido de sódio ou potássio (entre 10-30%) filtrando-se, o filtrado se trata com ácido clorídrico ou sulfúrico de uma concentração entre 10-30%, filtrando-se de novo o produto formado, finalmente se lava com água destilada até obter um pH neutro. Esta operação se repete até a total purificação do produto, não sendo necessária fazer uma nova purificação do composto usando outros procedimentos como recristalização ou coluna cromatográfica (a pureza foi determinada mediante a técnica HPLC). Rendimento obtido 89% do produto puro, ponto de fusão de: 155-156 °C.

Exemplo 2.

Obtenção da 1,5-Bis(3-metoxi-4-acetoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona.

Mistura-se 1,5-Bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona com um excesso de anidrido acético e de acetato de sódio. Aquece-se numa faixa de temperatura compreendida entre 20 e 110°C por um período de tempo entre 30 minutos e 3 horas. O produto obtido é colocado em água destilada com gelo. Decanta-se e recristaliza-se o produto com etanol a quente. Rendimento: 58% . Ponto de fusão: 150°C.

Exemplo 3.

Obtenção da 1,5-Bis[3-metoxi-4-(3-metil-but-2-eniloxi)fenil]-penta-1,4-dien-3-ona.

Uma mistura formada por 1,5-Bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (2

mmol) em 10 mL de dimetilformamida e carbonato de potássio (6 mmol) se agita dentro de uma faixa de temperatura compreendida entre 20-50 °C durante um período de tempo de 20 a 60 minutos em atmosfera inerte (argônio ou nitrogênio). A continuação se adicionam gota a gota 3 mmol de brometo de 3-metil-but-2-enila com agitação constante. Posteriormente se continua agitando por espaço de outras 5-8 horas com corrente de gás inerte colocando-se todo o conteúdo da mistura em água com gelo. Se extrai com clorofôrmio em três ocasiões com cerca de 30 mL deste solvente. A fase orgânica se lava com uma solução de NaHSO₄ e seguidamente com água destilada. A fase clorofôrmica se seca com sulfato de sódio anidro, depois se filtra e se rotoevapora o solvente. A purificação do produto principal é feita com auxílio de uma coluna cromatográfica recheada de sílica gel e usando como eluentes uma mistura de n-hexano / acetato de etila em uma relação apropriada. Rendimento: 53 % de uma substância líquida oleosa.

Exemplo 4.

Obtenção da 1,5-Bis(3,4-dimetoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona.

Procedimento de obtenção 1

A mistura de 3,4-dimetoxibenzaldeído e acetona em relação equimolar em presença de ácido clorídrico foi submetida ao banho de ultra-som na frequência de 25 a 40 kHz entre 10-60 minutos numa faixa de temperatura entre 25-60°C. Posteriormente, coloca-se o



produto obtido em água destilada com gelo e filtra-se o precipitado lavando-o com água destilada. A fase aquosa é extraída com clorofórmio e a fase clorofórmica, por sua vez, secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e rotoe-

5 vaporada. Rendimento: 87%.

Procedimento de obtenção 2

Mistura-se 1,5-Bis(4-hidroxi-

3-metoxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona com um excesso de sulfato de dimetila ou iodeto de metila em meio básico (KOH ou NaOH), agitando-se numa faixa de temperatura entre 25-50 °C durante um período de tempo que oscila entre 5-24 horas. A mistura formada se colocou em água gelada, filtrando-se o precipitado formado, neutralizando-se com HCl. Posteriormente se lava com água até pH neutro. Não foi necessária uma purificação posterior do produto. Rendimento: 85%.

10

15

Exemplo 5.

Obtenção da 1,5-Bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-iliden-malononitrila.

Em uma mistura formada por 1,5-Bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e malononitrilo em quantidades equimolares, acrescentam-se acetato de amônio, ácido acético e tolueno seguindo a variante de Cope, aquecendo-se em refluxo por um espaço de tempo compreendido entre 5-16 horas ou seguindo a terceira variante Knoevenagel usando piperidina como catalizador. O produto obtido é colocado em água destilada e gelo, filtrando-se o precipitado e extraíndo-se a fase

20

25

aquosa com clorofórmio e lavando-se a fase clorofórmica com água destilada. Posteriormente, seca-se a fase clorofórmica com sulfato de sódio anidro, filtra-se e rotoevapora-se. Rendimento: 76%. Ponto de fusão: 216°C.

5 Metodologia empregada para a realização dos testes antitumorais:

RELATÓRIO DO TESTE DE ANTIPROLIFERATIVO EM CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS COM O ENSAIO DA SULFORRODAMINA

10 B

Células

As linhagens celulares utilizadas nos ensaios, descritas na tabela 1, foram mantidas em frascos de 25 cm² (Nunc®), com 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino (RPMI/SFB), a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade.

TABELA 1. Linhagens celulares utilizadas nos ensaios de avaliação de atividade antiproliferativa.

Tipo celular	Código
Pulmão	NCI460
Mama	MCF-7
	NCI ADR*
Melanoma	UACC-62
Cólon	HT 29
Renal	786-0
Ovário	OVCAR-3
Próstata	PC-3
Leucemia	K-562

* linhagem celular que expressa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas.

Todos os procedimentos descritos abaixo, foram realizados sob condições estéreis (Fluxo Laminar Veco[®], Classe IIB2).

Procedimento Experimental

5 Foram inoculados 100 μ L de células em meio RPMI/SFB com 50 μ g/mL de gentamicina, nas suas respectivas densidades de inoculação, em placas de 96 compartimentos e incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade.

10 Após 24 horas, foram adicionados 100 μ L da substância teste nas seguintes concentrações de 250; 25; 2,5; 0,25 μ g/mL diluídas em RPMI/SFB/gentamicina. Neste momento foi feita a leitura de uma placa para determinação do T0 (controle de células no momento da adição da amostras). As demais placas foram incubadas por 48 horas. Após este período o experimento foi interrompido pela adição do ácido tricloroacético para a seguir determinar o conteúdo protéico através de ensaio colorimétrico com a sulforrodamina B.

20 Diluição das amostras

As soluções estoques foram desenvolvidas pela diluição das amostras em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) na concentração de 0,1g/mL. Para adição nas placas de 96 compartimentos essa solução foi diluída 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina, sendo assim obtida a concentração ideal de DMSO (Skehan e cols. 1990).

Ensaio da Sulforrodamina B**(SRB)**

Ao final do teste, as placas de 96 compartimentos foram centrifugadas por 3 minutos a 2000 rpm, e foram fixadas com 50 μ L de uma solução a 50% de ácido tricloroacético (TCA) a 4 °C. Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4 °C.

As placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários e mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

A coloração foi realizada pela adição de 50 μ L SRB a 0,4 % (peso/volume) dissolvidos em ácido acético a 1 %, e mantidas a 4 °C por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. O resíduo da solução de lavagem foi removido e as placas foram novamente secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base (Sigma®) na concentração de 10 μ M e pH 10,5 por 5 minutos em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em um leitor de microplacas (LabSystems Multiskan® MCC/340).

Análise dos resultados

Foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos

e através da fórmula abaixo foi determinada a inibição de crescimento (IC) de cada amostra testada.

$T > C$ a droga estimulou o crescimento, não apresenta IG.

5 Se $T \geq T_0$ mas $< C$, a droga foi citostática e a fórmula utilizada é $100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)]$

Se $T < T_0$ a droga é citocida e a fórmula utilizada é $100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)]$

10 Sendo que T é a média da absorbância da célula tratada C é o controle de célula e T_0 é o controle das células no dia da adição.

15 O resultado obtido foi subtraído de 100% obtendo-se então a porcentagem de inibição de crescimento. As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento dose dependente, maior que 50% e linhagem seletivo, isto é, atividade preferencial para um único tipo de célula tumoral ou com efeito citostático e/ou citocida bem distintos entre as linhagens celulares.

20 Todos os ensaios foram realizados em triplicatas sendo que os resultados apresentados referem-se a um experimento representativo. O desvio padrão da média foi sempre inferior a 5%.

25 Metodologia empregada para a realização dos testes toxicológicos:

Técnica

- Utilizam-se 10 camundongos swiss albinos, do sexo masculino, pesando aproximada-

mente 25g, para cada um dos grupos tratados e controle;

- Período de adaptação: os animais são mantidos na sala de testes pelo menos 07 dias antes do início do ensaio;

5 • Os animais são submetidos a jejum de 12 horas antes da administração da substância teste, feita por gavagem, quando o peso corporal dos animais é anotado.

10 . Após a administração os animais são mantidos em observação por um período mínimo de 14 dias.

• O número de animais mortos para cada uma das doses é anotado e a DL50 é calculada pelo método de Litchfield e Wilcoxon (1949) e o peso corporal dos animais no final do teste de toxicidade aguda é anotado.

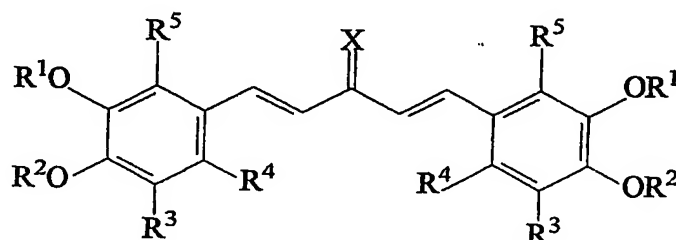
REIVINDICAÇÕES

1) " PROPRIEDADES AN-

TITUMORAIS DO 1,5-BIS(4-HIDROXI-3-METOXI-
FENIL)-PENTA-1,4-DIEN-3-ONA E DERIVADOS E

5 **SEU PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO "**, caracteri-
 zado por o método para a obtenção da 1,5-Bis(4-hidroxi-3-
 metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona e seus derivados como
 compostos com ação antitumoral, responder a seguinte
 fórmula geral:

10



onde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 e R^5 po-

dem representar átomos de hidrogênio, grupos prenilas,
 átomos de halogênios, ou grupos acetato ou alquila e X
 15 um átomo de oxigênio ou um grupo ilidenmalononitrila;
 método de obtenção das 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-
 penta-1,3-dien-3-onas e seus derivados, que são obtidos a
 partir de vanilina e acetona em relação molar 2:1 em meio
 ácido, a temperaturas que oscilam entre 25 e 60 °C, sob
 20 condições de irradiação ultra-sônica numa faixa de 25 a 40
 KHz por espaço de 1 a 3 horas colocando-se posterior-
 mente a mistura de reação em água / gelo até a formação
 do produto bruto, que se dissolve em uma solução de hi-
 dróxido de sódio ou potássio (entre 10-30%) filtrando-se;
 25 e o filtrado é tratado com ácido clorídrico ou sulfúrico de

uma concentração entre 10-30%, filtrando-se de novo o produto formado, finalmente se lava com água destilada até obter um pH neutro, sendo que esta operação se repete até a total purificação do produto, não sendo necessária fazer uma nova purificação do composto usando outros procedimentos como recristalização ou coluna cromatográfica (a pureza foi determinada mediante a técnica HPLC):
Rendimento obtido 92% do produto puro.

2) " PROPRIEDADES AN-

- 10 **TITUMORAIS DO 1,5-BIS(4-HIDROXI-3-METOXI-FENIL)-PENTA-1,4-DIEN-3-ONA E DERIVADOS E SEU PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO**", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo método de obtenção das 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,3-
- 15 dien-3-onas e seus derivados, que são obtidos a partir de vanilina e acetona em relação molar 2:1 em meio ácido durante 8 dias, a temperaturas que oscilam entre -10 °C e 40 °C, colocando-se a mistura de reação em água / gelo até a formação do produto bruto, que se dissolve em uma so-
- 20 lução de hidróxido de sódio ou potássio (entre 10-30%) filtrando-se; e o filtrado é tratado com ácido clorídrico ou sulfúrico de uma concentração entre 10-30%, filtrando-se de novo o produto formado, finalmente se lava com água destilada até obter um pH neutro, sendo que esta operação
- 25 se repete até a total purificação do produto, não sendo necessária fazer uma nova purificação do composto usando outros procedimentos como recristalização ou coluna cromatográfica (a pureza foi determinada mediante a técnica

HPLC): Rendimento obtido: 89% do produto puro, ponto de fusão de: 155-156 °C.

3) " **PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO 1,5-BIS(4-HIDROXI-3-METOXI-FENIL)-PENTA-1,4-DIEN-3-ONA E DERIVADOS E SEU PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO** ", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo método de obtenção das 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,3-dien-3-onas O e C-preniladas, onde os grupos prenilas
5
10 aparecem ligados ao átomo de oxigênio fenólico ou aos átomos de carbono do anel aromático, respectivamente.

4) " **PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO 1,5-BIS(4-HIDROXI-3-METOXI-FENIL)-PENTA-1,4-DIEN-3-ONA E DERIVADOS E SEU PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO** ", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo método de obtenção das 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,3-dien-3-onas O-preniladas, onde reagem quantidades equimoleculares ou em relação 2:1 da 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,3-dien-3-ona com brometo de prenila
15
20 mediante uma reação de substituição nucleofílica em presença de uma base (K_2CO_3 / DMF) ou (NaOMe / MeOH) a uma temperatura entre 20-40 °C durante um período de tempo compreendido entre 3-8 horas de reação em atmosfera inerte (Nitrogênio ou Argônio), neutralizando-se
25 posteriormente a mistura de reação num meio ácido (HCl, ou H_2SO_4 ou CH_3COOH). A purificação do produto isolado poder ser feita empregando-se uma coluna cromatográfica.

fica recheada com sílica gel e usando como solventes uma mistura de tolueno / acetato de etila ou n-Hexano / acetato de etila numa relação apropriada.

5) " **PROPRIEDADES AN-**

- 5 **TITUMORAIS DO 1,5-BIS(4-HIDROXI-3-METOXI-FENIL)-PENTA-1,4-DIEN-3-ONA E DERIVADOS E SEU PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO**", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo método de obtenção de 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,3-dien-
- 10 3-onas C-preniladas, onde reagem as 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,3-dien-3-onas O-preniladas em presença de N,N-dietilanilina e em atmosfera inerte (Nitrogênio ou Argônio) a uma temperatura que oscila entre 210-230 °C por espaço de 5-8 horas, seguida do tratamento da
- 15 mistura de reação mediante adição da quantidade necessária de clorofôrmio e as lavagens consecutivas com solução de ácido clorídrico e cloreto de sódio, seguida a secagem com sulfato de sódio anidro, rotoevaporando-se posteriormente; e o óleo amarelo formado se dissolve em metanol tratando-o com um pouco de Amberlite IR-120, agitando-se por espaço de 10 a 60 minutos a uma temperatura que oscila entre 20-40 °C, filtrando-se a temperatura ambiente; e finalmente se rotoevapora a solução metanólica formada, sendo purificado o produto de reação mediante
- 20 uma coluna cromatográfica recheada com sílica gel e usando como solventes de eluição uma mistura formada por tolueno / acetato de etila numa relação apropriada.

6) " PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO 1,5-BIS(4-HIDROXI-3-METOXIFENIL)-PENTA-1,4-DIEN-3-ONA E DERIVADOS E SEU PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO ", de acordo

5 com a reivindicação 1, caracterizado pelo método de obtenção das 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,3-dien-3-onas O e C-preniladas partindo da vanilina O e C-prenilada ou vanilina bromada ou vanilina alquilada, reagindo com acetona numa relação molar 2:1 em meio básico
10 co (NaOH ou KOH) seguida da correspondente neutralização com ácido clorídrico ou sulfúrico ou acético; e a purificação do produto isolado poder ser feita empregando-se uma coluna cromatográfica recheada com sílica gel e usando como solventes uma mistura de tolueno / acetato
15 de etila ou n-Hexano / acetato de etila numa relação apropriada.

7) " PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO 1,5-BIS(4-HIDROXI-3-METOXIFENIL)-PENTA-1,4-DIEN-3-ONA E DERIVADOS E SEU PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO ", de acordo

20 com a reivindicação 1, caracterizado pelo método de obtenção dos derivados Knoevenagel. Em uma mistura formada por 1,5-Bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e malononitrilo ou cianacetato de etila ou cianacetato de metila em quantidades equimolares, acrescentam-se acetato de amônio, ácido acético e tolueno seguindo a variante de Cope, aquecendo-se em refluxo por um
25 espaço de tempo compreendido entre 5-16 horas ou se-

guindo a terceira variante Knoevenagel usando piperidina como catalizador. O produto obtido é colocado em água destilada e gelo, filtrando-se o precipitado e extraíndo-se a fase aquosa com clorofórmio e lavando-se a fase clorofórmica com água destilada. Posteriormente, seca-se a fase clorofórmica com sulfato de sódio anidro, filtra-se e roto-evapora-se.

R E S U M O
" PROPRIEDADES ANTI-
TUMORAIS DO 1,5-BIS(4-HIDROXI-3-METOXI-
FENIL)-PENTA-1,4-DIEN-3-ONA E DERIVADOS E
SEU PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO "

A presente patente de invenção relata as propriedades antitumorais do 1,5-Bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e derivados e seu procedimento de obtenção: a amostra denominada composto 37 foi obtida com alto rendimento e pureza através da técnica ultrasônica apresentando atividade citostática (inibição do crescimento) nas concentrações avaliadas e atividade citocida (morte celular) a partir da concentração de 0,25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ frente a nove diferentes tipos de câncer humano. Este composto possui uma DL_{50} , igual a 8,54g/Kg. Isto significa que este produto pode considerar-se como praticamente atóxico, sendo que a Doxorubicina, medicamento anticancerígeno usado como referência em todos estes testes, é um produto extremadamente tóxico (DL_{50} de 20mg/Kg) e não inibe o crescimento da linhagem celular Mama NCI-ADR (linhagem celular que expressa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas), portanto nosso produto se mostrou com ação fortemente citostática. Os outros derivados apresentaram também forte ação citostática e citocida, principalmente o composto denominado por EHB1.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.